

# 苦瓜 SRAP 反应体系的建立与优化

郭大龙, 吴正景, 郑玉萍, 韩璐, 齐庆智

(1. 河南科技大学林学院, 河南洛阳 471003; 2. 河南科技大学图书馆, 河南洛阳 471003)

**摘要** [目的] 分子标记技术的快速发展为在 DNA 水平上估计苦瓜种质的遗传差异提供了更准确、更高效的方法。[方法] 采用正交试验设计, 对影响苦瓜 SRAP 反应体系的 5 种因素 ( $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、Taq 聚合酶及模板 DNA) 4 个水平进行优化筛选。[结果] 确立了适合苦瓜 SRAP 分析的优化反应体系, 即  $1 \times$  buffer,  $1.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$  模板 DNA,  $1.5 \text{ mmol}/\text{L}$   $Mg^{2+}$ ,  $0.3 \text{ mmol}/\text{L}$  dNTPs,  $0.5 \mu\text{mol}/\text{L}$  引物,  $0.075 \text{ U}/\mu\text{l}$  Taq 聚合酶, 总体积  $20 \mu\text{l}$ 。[结论] 优化的 SRAP PCR 反应体系的建立为利用 SRAP 技术进行苦瓜种质资源分类、遗传图谱构建和基因定位奠定了技术基础。

**关键词** SRAP; 苦瓜; 正交设计; 优化

中图分类号 S642.5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)18-07583-03

## Establishment and Optimization of SRAP Amplification System in Bitter Melon (*Momordica charantia* L.)

GUO Da-long et al. (College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

**Abstract** [Objective] Molecular marker provided a more reliable and efficient method to evaluate the genetic diversity for bitter melon. [Method] The optimum SRAP PCR reaction system in bitter melon (*Momordica charantia* L.) was established with orthogonal design on four levels of five factors ( $Mg^{2+}$ , dNTPs, primer, Taq polymerase and DNA template). [Result] In a total volume of  $20 \mu\text{l}$  SRAP-PCR system, the optimum SRAP-PCR reaction system contained  $1 \times$  buffer,  $1.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$  DNA template,  $1.5 \text{ mmol}/\text{L}$   $Mg^{2+}$ ,  $0.3 \text{ mmol}/\text{L}$  dNTPs,  $0.5 \mu\text{mol}/\text{L}$  primer and  $0.075 \text{ U}/\mu\text{l}$  Taq polymerase. [Conclusion] The optimized SRAP PCR reaction system would provide the basis for the analysis of diversity, map construction and gene localization of important traits of bitter melon with SRAP markers.

**Key words** SRAP; *Momordica charantia* L.; Orthogonal design; Optimization

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 又名锦荔枝、赖葡萄, 为葫芦科苦瓜属植物, 苦瓜的未成熟果实因具有特殊苦味而得名。长期以来, 苦瓜只在我国南方地区作为一种特殊蔬菜大量栽培。随着人们对苦瓜营养价值和诸多食疗功效的重新认识, 近年来我国苦瓜的栽培面积逐年扩大。分子标记技术的快速发展为在 DNA 水平上估计苦瓜种质的遗传差异提供了更准确、更高效的方法<sup>[1-2]</sup>。但是, 由于苦瓜各品种间的亲缘关系不甚明了, 影响着有性杂交亲本的选择和选配。SRAP 技术自诞生以来, 已被国内外学者广泛应用于植物遗传资源分析、品种鉴定、遗传连锁图谱的构建、基因定位等研究领域<sup>[3-4]</sup>。但是, 迄今还没有 SRAP 标记技术在苦瓜上应用的研究报道。为此, 笔者应用正交设计法, 对影响 PCR 扩增的  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、Taq 聚合酶、引物浓度等因素进行优化, 并检测该优化体系的适用性, 以期应用于苦瓜品种分子鉴定、分子进化、系统发育和遗传关系分析等研究。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 供试材料为青皮大肉苦瓜, 种子购自新乡市华盛种业有限公司。在穴盘中种子刚刚长出 2 片真叶时取样。取幼嫩的苦瓜叶片, 用清水洗净后在液氮中迅速研磨至细碎粉末状或液氮速冻后  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取。** 以苦瓜幼嫩的叶片为材料, 采用改良 CTAB 法提取 DNA<sup>[1]</sup>, 采用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 质量。稀释至所需浓度后,  $-20^\circ\text{C}$  保存。

**1.2.2 正交设计。** 采用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计, 对 SRAP 反应体系中的  $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、Taq 聚合酶浓度、引物浓度、模板 DNA 浓度进行 5 因素 4 水平 16 个组合的筛选, 方案如表 1 和表 2 所示。SRAP 引物根据 Li 和 Quiricos 发表的引物序列<sup>[3]</sup>, 由上海生物工程有限公司合成。

**1.2.3 PCR 扩增。** 反应体系总体积为  $20 \mu\text{l}$ , 扩增程序为:

表 1 苦瓜 SRAP 反应体系正交设计因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design in SRAP reaction system in bitter melon

水平 Level	因素 Factor				
	模板 DNA 浓度 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Template DNA concentration	$Mg^{2+}$ 浓度 $\text{mmol}/\text{L}$ $Mg^{2+}$ concentration	dNTPs 浓度 $\text{mmol}/\text{L}$ dNTPs concentration	引物浓度 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Primer concentration	Taq 聚合酶浓度 $\text{U}/\mu\text{l}$ Taq enzyme concentration
1	1.0	1.5	0.2	0.3	0.025
2	1.5	2.0	0.3	0.4	0.050
3	2.0	2.5	0.4	0.5	0.075
4	2.5	3.0	0.5	0.6	0.100

94 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 35 复性 1 min, 72 延  
伸 1 min, 5 个循环; 94 变性 1 min, 50 复性 1 min, 72 延

伸 1 min, 35 个循环; 72 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 经溴化乙锭 (EB) 染色后在凝胶成像分析系统上采集图像。

**1.2.4 反应体系稳定性的检测。** 选择另外 2 对 SRAP 引物作为检测引物, 用优化的苦瓜 SRAP 反应体系, 对随机选取的 4 个苦瓜基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 每对引物重复 3 次。检测引物的序列见表 3。

基金项目 河南科技大学人才启动基金 (09001163); 河南科技大学校基金 (2007QN014)。

作者简介 郭大龙 (1978-), 男, 湖北十堰人, 博士, 副教授, 从事种质资源方面的研究。

收稿日期 2008-04-16

表2 SRAP-PCR 反应 $L_{16}(4^5)$  正交试验设计Table 2  $L_{16}(4^5)$  orthogonal design in SRAP PCR reaction

编号 No.	$Mg^{2+}$ 浓度 $Mg^{2+}$ concentration	Taq 聚合酶浓度 Taq polymerase concentration	dNTPs 浓度 dNTPs concentration	引物浓度 Primer concentration	模板 DNA 浓度 Template DNA concentration
1	1.5	0.025	0.2	0.2	1.0
2	2.0	0.050	0.3	0.3	1.0
3	2.5	0.075	0.4	0.4	1.0
4	3.0	0.100	0.5	0.5	1.0
5	1.5	0.100	0.3	0.4	1.5
6	2.0	0.075	0.2	0.5	1.5
7	2.5	0.050	0.5	0.2	1.5
8	3.0	0.025	0.4	0.3	1.5
9	1.5	0.050	0.4	0.5	2.0
10	2.0	0.025	0.5	0.4	2.0
11	2.5	0.100	0.2	0.3	2.0
12	3.0	0.075	0.3	0.2	2.0
13	1.5	0.075	0.5	0.4	2.5
14	2.0	0.100	0.4	0.2	2.5
15	2.5	0.025	0.3	0.5	2.5
16	3.0	0.500	0.2	0.3	2.5

表3 检测用引物的序列

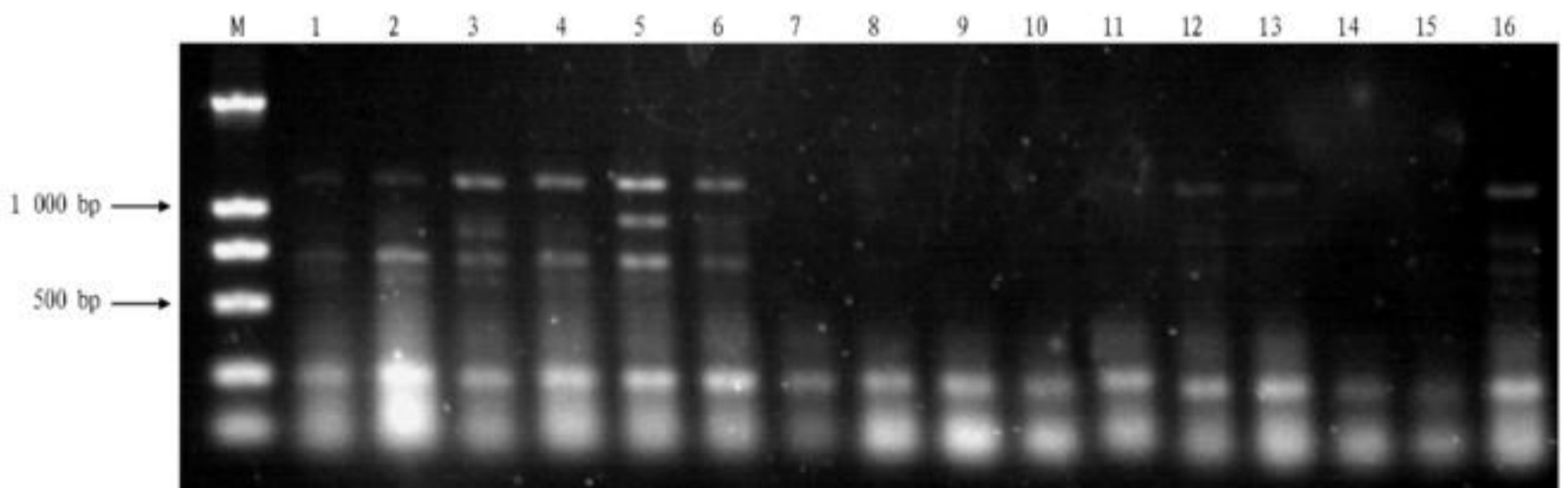
Table 3 Primer sequences for detection

编号 Code	正向引物 Forward primer	编号 Code	反向引物 Reverse primer
M2	5-TGAGTCAAACCGGAGC-3	En8	5-GACTGCGIACGAATTGAC-3
M4	5-TGAGTCAAACCGGACC-3	En4	5-GACTGCGIACGAATTTGA-3
M5	5-TGAGTCAAACCGGAAG-3		

## 2 结果与分析

**2.1 苦瓜 SRAP 反应体系的正交优化** 正交试验设计 SRAP-PCR 反应体系选取 M2/En8 作为引物,以“翠绿”DNA 为模板进行扩增,电泳结果见图 1。考察了 DNA、 $Mg^{2+}$ 、dNTPs、Taq 酶、引物 5 种 SRAP 反应成分浓度变化对扩增结果的影响,得到稳定、重复性好的反应体系。模板 DNA 含量是制约扩增产量、特异性的一个因素。一般,有一个较宽的

浓度适宜范围,但太少时无扩增带,太多时特异带又很难出现。根据各处理平均片段数,模板 DNA 含量在 1.0 ng/ $\mu$  时效果最佳。 $Mg^{2+}$  浓度除影响酶活性外,也影响引物的退火、模板和中间产物的解离温度、产物的特异性、引物二聚体的形成等。根据各处理平均片段数, $Mg^{2+}$  浓度为 1.5、2.0 mmol/L 时最佳。底物 dNTPs 浓度过高,会导致聚合酶错误的掺入;浓度过低,又会影响合成效率。该试验结果表明,dNTPs 浓度为 0.2、0.3 mmol/L 时最好。引物浓度是影响 SRAP 扩增的重要因素。结果表明,当引物浓度为 0.5  $\mu$ mol/L 时产生的条带数最多,亮度也最亮,此时可得到较好的扩增结果。Taq 酶用量是决定反应成功与否的直接因素。该试验中 Taq 酶对扩增片段亮度有明显影响。根据各处理平均片段数,Taq 酶在 0.075 U/ $\mu$  时最佳。



注:M 为 DNA marker 2000;1~16 为表 2 中编号。

Note: M. DNAmaker2000;1~16. No. of treatments in Table 2.

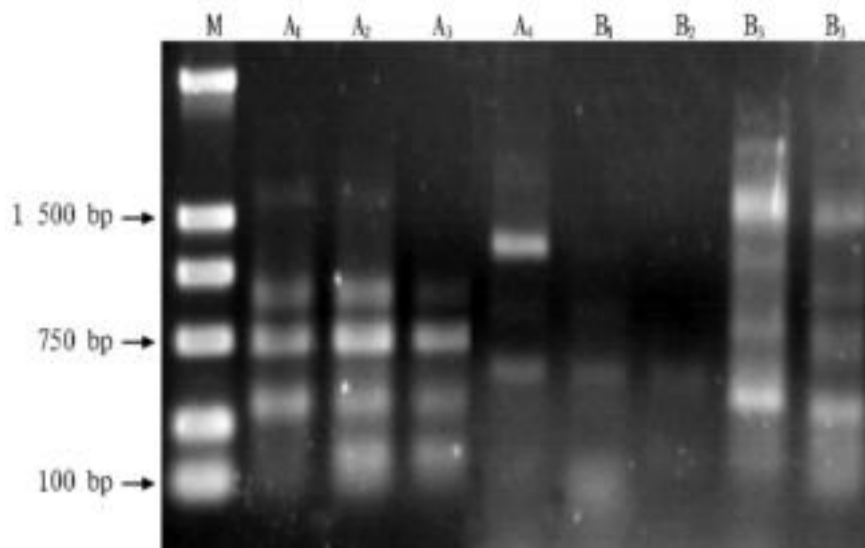
图1 苦瓜 SRAP 扩增电泳

Fig.1 Electrophoretogram of SRAP amplification of bitter melon

由图 1 可知,处理 4 的条带数显著多于其他处理,虽然相互之间无明显差异,但综合扩增的平均片段数和扩增片段亮度可知处理 4 应该是相对较好的组分浓度,即最佳处理体系为 1.0 ng/ $\mu$  模板 DNA,1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ,0.3 mmol/L dNTPs,0.5  $\mu$ mol/L 引物,0.075 U/ $\mu$  Taq DNA 聚合酶,1 ×

buffer,体系总体积 20  $\mu$ 。

**2.2 反应体系的确定** 选择引物组合 M4/En4、M5/En8,随机挑选 4 个模板,对反应体系的稳定性进行检测。由图 2 可知,这些引物组合能扩增出多态性强、条带清晰、重复性和稳定性较好的结果,该反应体系适合苦瓜 SRAP-PCR 反应。



注:M为DL2000 marker; A、B分别为引物组合 M4/ En4、M5/ En8; 1, 2, 3, 4 分别代表翠绿、白玉、夏丰、大顶苦瓜。

Note: M, DL 2000 marker; A, B represent for primer combination M4/ En4 and M5/ En8; 1, 2, 3 and 4 represent for Cui lu, Baiyu, Xiafeng and Dading bitter melon.

图2 苦瓜SRAP 优化体系的检测结果

Fig. 2 Testing result of optimized SRAP system of bitter melon

### 3 讨论

作为一种新型的分子标记,SRAP 具有操作简单、稳定和高效等特点,适用于不同作物上的各种研究,包括图谱构建、基因定位和基因克隆等。目前,已在马铃薯、水稻、小麦、油菜、棉花、苹果、西瓜、柑橘、樱桃、柿、梅子、大蒜、莴苣、芹菜、黄瓜、辣椒等植物中应用<sup>[5]</sup>。但是,在不同作物的研究中,所采用的PCR 体系、程序不同<sup>[6-8]</sup>。影响SRAP 扩增效果的技术环节主要包括DNA 的提取以及扩增体系、扩增产物的检测。一般,扩增程序较大地影响扩增效果。例如,SSR 等分子标记技术由于不同的作物有不同的SSR 引物组合,所以对退火温度进行调整。但是由于SRAP 引物具有通用性,不同作物采用的引物组合往往相同,所以扩增程序对结果的影响不大,在此不作考虑。

SRAP 分子标记的特点是多态性高,产率中等,重复性好,操作简单,在基因组中分布均匀,较易对扩增得到的目标片段进行测序;引物具有通用性,而且其正向引物可以与反向引物两两搭配组合。因此,用少量的引物可以组配得到多

个引物对,提高了引物的使用效率,降低成本。对于遗传资源狭窄的作物,如苦瓜等葫芦科作物必须选择一种多态性高的分子标记方法才能有效进行种质鉴别。前人的研究表明,无论是利用蛋白质还是同工酶都很难进行鉴别,而利用分子标记中RAPD 技术需要经过大量引物的筛选,多态性较低。利用多态性较高的AFLP 技术可以建立指纹图谱,有效区分不同品种。但是,AFLP 需要酶切、连接、扩增杂交等繁琐的技术步骤。该试验用SRAP 进行标记显示了较高的多态性。SRAP 上游引物和下游引物可以通用,两两搭配组合,省去了引物开发的困难,在种质资源鉴定、遗传图谱的构建乃至种子纯度检测方面具有广泛的应用前景<sup>[9]</sup>。

试验表明,苦瓜SRAP-PCR 扩增的最佳反应体系是1.0 ng/  $\mu$  模板DNA,1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ,0.3 mmol/L dNTPs,0.5  $\mu$ mol/L 引物,0.075 U  $\mu$  Taq DNA 聚合酶,1  $\times$ buffer,体系总体积20  $\mu$ 。该体系对苦瓜材料进行SRAP-PCR 扩增,能够扩增出较清晰的条带,且稳定性较好,说明该反应体系适合苦瓜SRAP-PCR 反应。

### 参考文献

- [1] 张长远,孙妮,胡开林. 苦瓜品种亲缘关系的RAPD 分析[J]. 分子植物育种,2005,3(4):515-519.
- [2] DEY S S, SINGH A K, CHANDEL D, et al. Genetic diversity of bitter melon (*Morinda charantia* L.) genotypes revealed by RAPD markers and agronomic traits[J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 109: 21-28.
- [3] LI G, QURCCOS C F. Squence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [4] FERRIOLI M, HICO B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271-282.
- [5] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记-SRAP 与TRAP 及其应用[J]. 遗传, 2004, 26(5): 777-781.
- [6] 郭大龙, 罗正荣. 部分柿属植物SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 138-141.
- [7] 王振国, 张海英, 于广建, 等. 黄瓜SRAP 反应体系的正交设计优化[J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 112-115.
- [8] 尚明照, 何宁, 殷冬梅, 等. 花生基因组SRAP-PCR 体系的优化[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 99-103.
- [9] 李严, 张春庆. 新型分子标记-SRAP 技术体系优化及应用前景分析[J]. 中国农学通报, 2005(5): 108-112.

(上接第7576 页)

(random amplified polymorphic DNA, RAPD) 的研究, 这可能是由于RAPD 对DNA 的要求不高的原因, 但是采用新鲜材料制备的DNA 进行PCR 扩增的效果明显优于放干的材料。

### 3 结论与讨论

由于同一植物不同组织的结构及生化成分各不相同, 而这些结构和成分上的差异对DNA 的不同提取方法往往会造成不同程度的影响, 导致了不同提取方法所得DNA 在纯度和产量上的差异。因此, 在实际工作中, 应根据试材的生化成分和材料保存时间来筛选或建立适当的提取方法<sup>[4]</sup>。附子的不同部位提取基因组DNA 质量有差异, 叶片比块根得率高、纯度高, 这可能与块根中含有较多的多糖、蛋白质和酚类等杂质有关<sup>[5]</sup>。从附子新鲜材料和放干材料提取的基因组DNA 质量也有差异, 鲜材料比干材料纯度高、得率高, 这与干材料贮存时间过久, 导致DNA 大部分降解有关<sup>[6]</sup>。

该试验所采用的3 种方法均能提取到中药材附子药源植物的基因组DNA, 但综合分析发现, 采用SDS 法对新鲜叶子提取的基因组DNA 效果最佳, 能够稳定性制备高质量附子基因组DNA, 而采用改良CTAB 法对新鲜附子(鲜根) 进行DNA 提取的效果最好, 说明改良CTAB 法的除杂效果最佳。

### 参考文献

- [1] 蒋细旺, 包满珠, 李智崎, 等. 菊花DNA 提纯方法的优化[J]. 汉江大学学报, 2002, 19(3): 42.
- [2] 黄建安, 黄意欢. 茶树基因组DNA 的高效提取方法[J]. 湖南农业大学学报, 2003, 29(5): 402.
- [3] 王孝安, 肖娅萍, 胡雅琴. 太白红杉3 种不同材料总DNA 的提取[J]. 西北植物学报, 2003, 23(4): 641.
- [4] 叶冰莹, 陈由强, 庄振宏, 等. 阔叶榉总DNA 的提取及其RAPD 反应条件的研究[J]. 厦门大学学报, 2002, 41(5): 683.
- [5] 张娟, 张道远, 尹林克. 刚毛柃柳基因组DNA 提取和RAPD 反应条件探索[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 253.
- [6] SCOTT O R, BENJICH A J. Extraction of DNA from plant tissue[J]. *Rat Bd Mnd*, 1998(6): 1.